

Präparation und Reinigung von Milligramm-Mengen der caninen Fibrin(ogen)-Spaltprodukte (FSP) -X, -Y, -D und -E

Preparation and separation of milligram amounts of the canine fibrinogen degradation products (fdp) X, Y, D and E

H. Wolling und R. Mischke
 Mit 5 Abbildungen

Eingegangen am 20.5.1995

Einleitung

Fibrinogen ist der zentrale Effektor der Blutgerinnung. Am Ende der endogenen sowie der exogenen Blutgerinnungskaskade steht die Aktivierung von Thrombin, die thrombinkatalysierte Abspaltung der Fibrinopeptide A und -B vom Fibrinogen und die damit erfolgende Umwandlung in Fibrinmonomere. Diese polymerisieren dann spontan zum Fibringerinnsel, das sekundär über die ebenfalls durch Teile der Blutgerinnungskaskade aktivierte calciumabhängige Transglutaminase (Faktor XIII) mit Peptidbindungen kovalent verknüpft wird. Das quervernetzte Gerinnsel kann nur noch durch proteolytische Spaltung mit Plasmin wieder abgebaut werden (Pacques, 1989).

Das ~330 kDa große Fibrin- und das ~340 kDa große Fibrinogenmolekül bieten dem Plasmin mehrere spezifische Spaltstellen, an denen die Proteolyse mit unterschiedlicher Kinetik abläuft (Abb. 1). So entstehen beim Hund analog dem Menschen aus Fibrinogen zunächst die großen, „frühen“ Spaltprodukte: die X-Fragmente mit Molekulargewichten von 254–319 kDa, die Y-Fragmente mit Molekulargewichten von 146–196 kDa und ein kleines Spaltprodukt: das F-Fragment mit Molekulargewichten von 31–42 kDa, das in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt wurde. Alle diese Fibrinogenspaltprodukte (FSP) existieren nur vorübergehend und werden weiter abgebaut. Mit etwas langsamerer Kinetik entstehen die „späten“ FSP: die D-Fragmente mit Molekulargewichten von 85–112 kDa und die E-Fragmente mit 43–52 kDa. Einige dieser D- und E-Fragmente sind stabil und unterliegen keiner weiteren, erkennbaren Proteolyse (Mischke und Wolling, 1994).

Beim Hund wird die Messung der FSP als ein regelmäßig angewandtes Nachweisverfahren bei Verdacht auf eine gesteigerte Fibrinolyse durchgeführt – in erster Linie zur Diagnosestellung und Verlaufskontrolle einer Verbrauchskoagulopathie mit sekundärer Hyperfibrinolyse. Primäre Hyperfibrinolyse treten beim Hund nur selten auf (Slappendel, 1988; Mischke und Nolte, 1992).

Entstehung, Funktion und Aufbau sind bei menschlichen FSP sehr gut untersucht und dokumentiert (Gaffney, 1977; Furlan 1988). Anders ist es bei den caninen FSP, die im veterinärmedizinischen Labor in der Regel als identisch zu den humanen FSP betrachtet werden (Slappendel, 1988; Hammer et al., 1991). Die zur FSP-Messung eingesetzten Agglutinationsassays verwenden eine hochspezifische Eigenschaft – die Erkennung bestimmter Oberflächenstrukturen (Epitope). Die Überprüfung von Kreuzreaktivität und Sensitivität der zur Bestimmung humaner FSP hergestellten FSP-Testsysteme, sowie die Überprüfung des Einflusses einzelner FSP auf die ver-

schiedenen im Labor verwendeten Gerinnungstests erforderte die Präparation der caninen FSP und deren Aufreinigung bis zu einer hohen Reinheit.

Ein erster Schritt waren die kinetischen Untersuchungen (Mischke und Wolling, 1994) in denen die jeweils optimalen Bedingungen und Stoppzeitpunkte für eine weitergehende chromatographische Reinigung der „frühen“ FSP (X- und Y-Fragmente) und der „späten“ FSP (D- und E-Fragmente) ermittelt wurden. Im folgenden Schritt wurden verschiedene chromatographische Methoden eingesetzt, um aus den jeweils spezifisch angereicherten Fragmentlösungen einzelne, reine FSP zu isolieren.

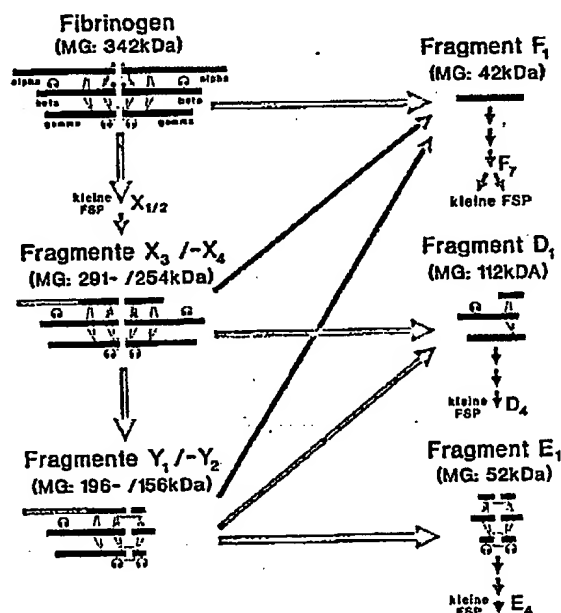


Abb. 1 Schema zur Entstehung der caninen Fibrinogenspaltprodukte (FSP). Bis auf die nur in Spuren auftretenden X₁- und X₂-Fragmente werden immer die größten Subfragmente eines Spaltproduktes dargestellt. Die großen Pfeile geben die primären Spaltungen und dabei entstehende Produkte an, die kleinen Pfeile nachfolgende Abspaltungen von Fibrinopeptiden, die zu kleineren FSP der gleichen Gruppe führen. Zur Darstellung der Moleküle: Die Balken repräsentieren die Aminosäureketten, die dünnen Linien die Disulfidbrücken und Kreise mit KH die Kohlenhydratseitenketten. Die gerasterten Balkenteile sind bei dem kleineren Fragment abgespalten

Material und Methoden

A) Herstellung von caninem Fibrinogen:

Klinisch gesunden Hunden (Beagles) wurde Blut entnommen und mit 0,011 M NaCitrat als Antikoagulant versetzt. Das nach Zentrifugation (20 min, 2000 g, 4 °C) erhaltene plättchenarme Plasma wurde durch eine 3x durchgeführte Glycinfällung nach Kazal et al. (1963) bis zur elektrophoretisch kontrollierten > 95%igen Reinheit angereichert (Mischke und Wolling, 1994). Zur Entfernung des restlichen am Fibrinogen gebundenen Ca^{2+} wurde nach der 1. und der 2. Fällung Resuspensionspuffer mit 5 mM Na_2EDTA zugegeben und restliches EDTA und Ca^{2+} EDTA mit der 3. Fällung, Auflösen des Sediments in EDTA-freiem Puffer und nachfolgender 20stündiger Dialyse gegen 50 mM Tris; pH 7,4 + 0,9% NaCl + 0,025% NaN_3 entfernt.

B) Spaltungsansätze:

10 ml des so hergestellten Fibrinogen-Konzentrates (entsprechend 150–200 mg Protein) wurden für einen Spaltungsansatz verwendet und ein Teil der Ansätze mit 20 μl einer 0,1 M CaCl_2 -Stammlösung auf 0,2 mM CaCl_2 eingestellt.

Pro 100 mg Fibrinogen wurde mit 10 CU (Casein Unit) Plasmin (Chromogenix AB, Haemochrom GmbH, Essen) bei 37 °C im Wasserbad gespalten und die Proteolyse zur Gewinnung der frühen FSP (X und Y) nach 3,5 min durch Zusatz von 2000 KIU (Kallikrein Inhibitor Unit) Aprotinin/ml (Handelsname Trasylol, Bayer Leverkusen, Serinproteaseninhibitor, $K_i = 1 \text{ nM}$ für Humanplasmin) unterbrochen.

Zur Gewinnung der kleinen, bzw. späten FSP (D und E) wurde ein identischer Ansatz über 1–2 h bei 37 °C inkubiert und analog durch Zugabe von Aprotinin gestoppt.

Abweichend von der zunächst gewählten Vorgehensweise (Mischke und Wolling, 1994) enthielten die meisten Spaltungsansätze den oben angegebenen Zusatz von 0,2 mM Ca^{2+} , da durch Ca^{2+} beim Hund (Wolling und Mischke, 1995) – wie auch bei anderen Spezies (Ly und Godal, 1973; Haverkate und Timan, 1977; Marguerie, 1977) – eine Stabilisierung bestimmter X-, Y- und D-Fragmente eintrat und so weniger Subfraktionen dieser Fragmente entstanden. Dies erleichterte die Aufreinigung und entsprach zudem den physiologischen Bedingungen (Hundeplasma enthält 1,22–1,44 mM ionisiertes [freies] Ca^{2+} [Möller, 1992]).

C) Chromatographisches Gerät und Material:

Zur Aufreinigung der FSP wurde eine präparative Niederdruck-Chromatographiestation (bis 5 bar) von Pharmacia (Freiburg), bestehend aus einem LC-Controller mit binärem Gradientenmischer (GP10), einer Niederdruck-Kolbenpumpe (P50), einem UV-Monitor (SII) und einem Fraktionensammler (Redifrac 200) eingesetzt. Die Anlage wurde bei Raumtemperatur (20–24 °C) betrieben.

Zur Verfügung standen einmal eine bereits gepackte Superdex 200 pg-Säule (Molekularsieb, Länge: 60 cm, Durchmesser: 2,6 cm, Trennbereich: 400–30 kDa, Gelkugeldurchmesser: 40 μm , Pharmacia) sowie eine ebenfalls firmenseitig gepackte MPLC-Säule mit dem hochauflösenden Anionentauscher Fractogel EMD DEAE (S) (in „Superformance“-Säule; Länge: 15 cm, Durchm.: 1 cm, „Tentakelgel“ mit einem Gelkugeldurchm.: von 10 μm , Merck, Darmstadt).

Weiterhin wurden selbstgepackte Säulen mit Hydroxyapatit (Bio-Gel HT, BIO RAD, München; Länge: 20 cm, Durchm.: 1,6 cm), das Chromatofokussierungssystem PBE94 mit PB74 und PB96 (Länge: 32 cm, Durchm.:

1,4 cm, Pharmacia) und eine C5-Alkylsupercose HR-Säule (Länge 5 cm, Durchm.: 0,5 cm, Gelkugeldurchm.: 13 μm , Pharmacia) eingesetzt.

D) Präparation reiner FSP:

Alle im folgenden Abschnitt beschriebenen Trennungen wurden mit nur zwei Laufmitteln durchgeführt (TRA = Triäthanolamin, Puffer, $\text{pK}_a = 7,76$):

Laufmittel A: 20 mM TRA + 0,025% NaN_3 ; pH 7,4

Laufmittel B: 20 mM TRA + 1 M NaCl + 0,025% NaN_3 ; pH 7,4

Bei allen Läufen mit frühen Spaltprodukten wurde zur Verhinderung einer weiteren Spaltung durch Plasmin dem Laufmittel A noch 80 KIU Aprotinin/ml zugesetzt. Aprotinin störte als kleines Protein ($M_r = 6511$) mit alkalischem isoelektrischen Punkt (pI: 10,5) in den Trennungen nicht.

Reinigung mit Superdex 200 pg: Um eine optimale Auftrennung zu gewährleisten, sollte das Probenauftragsvolumen kleiner als 14 ml sein. Eluiert wurde mit etwa 330 ml 20 mM TRA + 100 mM NaCl; pH 7,4 und 1,5 ml/min Flußgeschwindigkeit. Die proteinhaltigen Fraktionen (mit Ext. > 0,05 OD [Optical Density]) wurden in 6 ml Portionen gesammelt.

Reinigung mit Fractogel EMD DEAE (S): Die Salzkonzentration des Probenauftrages sollte kleiner als 70 mM NaCl sein, da sonst erhebliche Mengen (> 10%) von D_A mit durchlaufen können. Im Anschluß wurde mit 20 ml Laufmittel A gespült. Probenauftrag und Spülen wurden mit einer Flußgeschwindigkeit von 1,6 ml/min durchgeführt, alle nachfolgenden Schritte mit 1,4 ml/min. Zur Elution der Proteine wurden je nach Fragestellung zwei verschiedene Verfahren angewendet:

- Bei der Reinigung von späten Spaltprodukten (D und E) wurden die Fragmente mit 100 ml eines Salzgradienten von 50–300 mM NaCl (in 20 mM TRA, pH 7,4) eluiert. Das proteinhaltige Eluat wurde in 6 ml-Fractionen gesammelt.

- Bei Einsatz der frühen Spaltprodukte wurde der Anionentauscher nur zur Konzentrierung verwendet. Somit wurden alle auf der Säule gebundenen Proteine nach Spülen mit 20 ml Laufmittel A mit einem 0,4 M NaCl Stufengradienten in einem schmalen Peak eluiert, welcher – soweit möglich – in einem Röhrchen (max. 12 ml) aufgefangen wurde.

Die Säule wurde mit 20 ml Laufmittel B gereinigt und mit 60 ml Laufmittel A wieder equilibriert.

E) Elektrophoretische Überwachung:

Jede chromatographische Trennung (nicht die Konzentrierungen) wurde mit Hilfe einer unter nichtreduzierenden Bedingungen durchgeführten SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, Puffersystem nach Weber und Osborne [1969] und Laemmli [1970]) überwacht. Für die frühen FSP wurden Gele mit $T_g = 7,5\%$ / $C_g = 3\%$, für die späten FSP Gele mit $T_g = 10\%$ / $C_g = 3\%$ verwendet. Trennung und Färbung erfolgten analog zu Mischke und Wolling (1994).

F) Bestimmung der Proteinkonzentration:

Die Proteinbestimmungen wurden mit dem CBB-Adhäsionsassay nach Bradford (1976) mit Hilfe einer kommerziellen Färbelösung (BIO RAD, München) durchgeführt (Makrotestansatz, Mittelwerte aus 3–6fach-Bestimmungen). Als Referenz für die jeweils mitgeführte Eichkurve (0,1–1,5 mg Protein/ml) wurde ein selbst hergestellter caniner Fibrinogenstandard (2,2 mg/ml) verwendet, dessen Bezugskonzentration als Median einer 10fach Messung nach Jacobsson (1955) ($\bar{x} = 2,19 \text{ mg/ml}$) ermittelt und mit dem CBB-Adhäsionstest gegen eine Referenz

aus einer 1 mg : 1 mg Mischung eines BSA- und IgG-Standards (BIO RAD) ($x = 2,26 \mu\text{g/ml}$) bestätigt wurde.

Ergebnisse

Die Chromatographie früher und später FSP ergab weder mit Hydroxyapatit noch mit der Chromatofokussierung eine befriedigende Trennung. Auch unter optimierten Bedingungen (für Hydroxyapatit: Elution der FSP mit 120 ml Phosphatgradient von 20–160 mM Natriumphosphat, pH 7,4 und für Chromatofokussierung: Probenauftrag auf eine mit 20 mM TRA, pH 8,0 equilibrierten PBE94-Säule, Elution mit 500 ml einer 1 : 10 verdünnten, mit 1 M HCl auf pH 4,0 eingestellten 4+1 Mischung aus PB74+PB96) eluierten immer mehrere Komponenten gleichzeitig.

Eine Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)-Trennung mit C5-Alkylsuperose war nicht durchführbar. Bis zur Ionenkonzentration von 2 M NaCl ergab sich keine Abscheidung auf das Gel. Ein Wechsel auf 1,5 M Natriumphosphat, pH 7,4 führte zu einer irreversiblen Ausfällung der FSP auf das Gelmaterial und damit zum Abbruch dieser Versuche.

Mit dem Anionentauscher ließ sich nur bei den späten FSP eine gute Trennung erzielen (s. u.), die frühen FSP eluierten, wie beim Hydroxyapatit, dicht aufeinander (zwischen 140 und 220 mM NaCl).

Die FSP X und Y konnten jedoch mit Hilfe einer Gelchromatographie (Molekularsieb) über die Superdex 200 pg-Säule getrennt werden. Die auch hier nur geringe Auflösung machte 2 bis 3 Rechromatographien über Superdex 200 pg bis zur SDS-elektrophoretischen Reinheit (> 95%) notwendig.

Die Fraktionierung der frühen FSP über Superdex 200 pg ergab folgendes Bild (Abb. 2):

Der direkt nach dem Ausschlußvolumen der Säule ($V_0 \sim 120 \text{ ml}$) eluierende, meist mit zwei Schukern versehene Hauptpeak wurde in drei Teile mit annähernd gleich großem Volumen aufgeteilt: Teil

1 war im wesentlichen ungespaltenes Fibrinogen ($V_e \sim 137 \text{ ml}$), Teil 2 überwiegend Fragment X ($V_e \sim 147 \text{ ml}$) und Teil 3 überwiegend Fragment Y ($V_e \sim 162 \text{ ml}$). Der sich anschließende zweite breite Peak bestand aus den verschiedenen D-Fractionen (s. u., $V_e \sim 195 \text{ ml}$) und den sich unter der abfallenden Flanke des Peaks verborgenden geringen FSP E- und deutlichen FSP F-Mengen. Die restlichen kleinen Peaks enthielten nur geringe Quantitäten kleinerer Spaltstücke (< 20 kDa), die nicht untersucht worden sind.

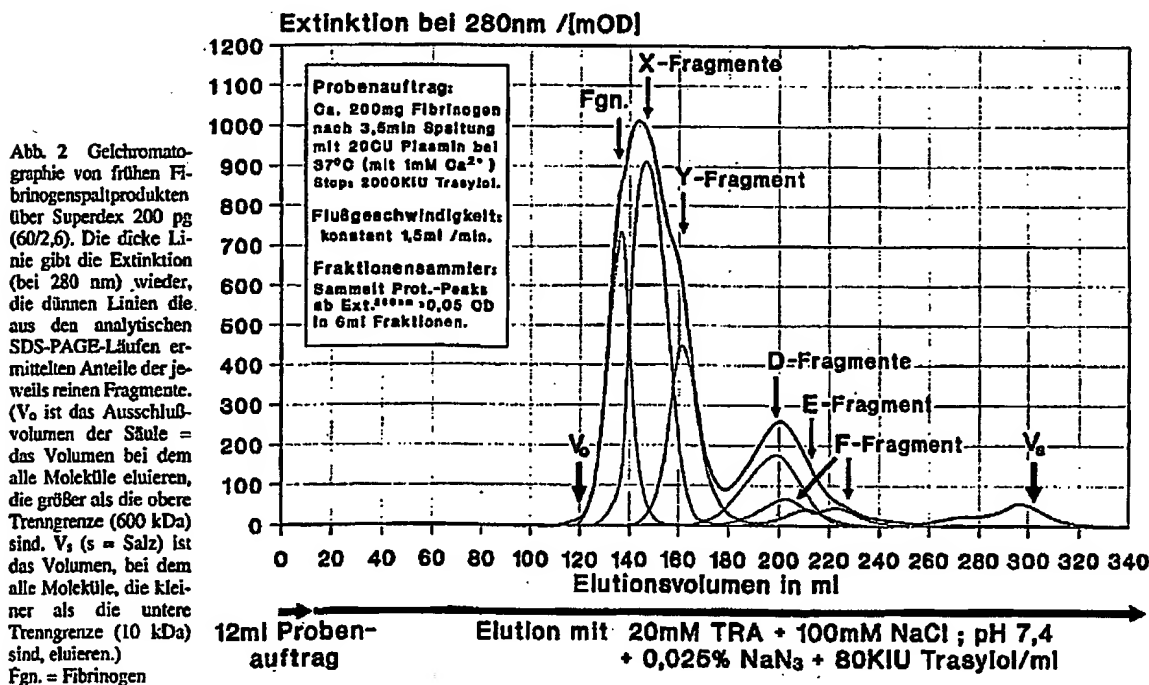
Die Reinigung der FSP X und Y wurde durch folgende Sequenz erreicht:

Die Mischung früher FSP wurde mit dem o. a. Molekularsieb über Superdex 200 pg vorgetrennt (Aufteilung in drei Pools: Fibrinogen, X-Fragment und Y-Fragment) und in einer Serie von drei kurzen Läufen jeder der drei Pools mit einem Stufengradientenlauf über Fractogel EMD DEAE (S) aufkonzentriert. Die so konzentrierten Pools wurden zur weiteren Reinigung wieder in einen Molekularsieb mit Superdex 200 eingesetzt und erneut fraktioniert (Beispiel: Abb. 3). Nach dreimaligem Durchlaufen dieses Zyklus aus Trennung und Konzentrierung lagen alle drei Komponenten in Konzentraten (Volumina von 4–14 ml mit 1,5–4,5 mg Protein/ml) vor, die auf einen Gehalt von > 95% angereichert waren (Kontrolle über SDS-PAGE).

Aus einer Präparation früher Spaltprodukte aus 150 mg Fibrinogen wurden so

- 49 mg Fibrinogen (= 32,7%),
- 35 mg Fragment X (= 23,3%) und
- 6,9 mg Fragment Y (= 4,6%) erhalten (Summe = 60,6%).

Der Pool der Fragmente D bis F im zweiten Peak enthielt ohne weitere Reinigung insgesamt 29 mg Protein (= 19,3%). Im Verlauf der Aufarbeitung trat ein Verlust von etwa 1/5 (20,1%) des eingesetzten Proteins auf.



Der Fibrinogenpool bestand im wesentlichen aus 2 nahe beieinanderliegenden Banden (einer starken bei 340 kDa und einer schwachen bei 314 kDa) und 3 sehr schwachen, hochmolekularen Banden (zusammen <4%).

Das gereinigte Fragment X erwies sich im SDS-Gel als aus 2 etwa gleichstarken Banden (X₂ bei 314 kDa und X₃ bei 281 kDa) bestehend. Einzige Verunreinigung war ein Rest Fibrinogen (<3%).

Das Y-Fragment ließ sich in einer Bande (Y₁ bei 196 kDa) mit geringer Verunreinigung durch Reste von Fragment X und Fragment D (jeweils <2%) darstellen.

In allen 3 gereinigten Fraktionen konnten außerdem noch Spuren niedermolekularer Verunreinigungen (30–63 kDa) beobachtet werden (gesamt immer <2%).

Die Molekularsiebtrennung der späten FSP-Lösung ergab folgendes Bild (Abb. 4): Der erste Hauptpeak (mit Fibrinogen, FSP X und Y) fehlte hier vollständig – abhängig von der noch vorhandenen Faktor XIII-Aktivität erschien ein unterschiedlich großer D-Dimer Peak. Das restliche Protein fand sich in dem nun sehr großen D-Fragment-Peak mit dem Fragment E in der abfallenden Flanke, einer ausgeprägten Schulter aus einem Rest F-Fragment und in 2 größeren Peaks mit kleinen FSP wieder.

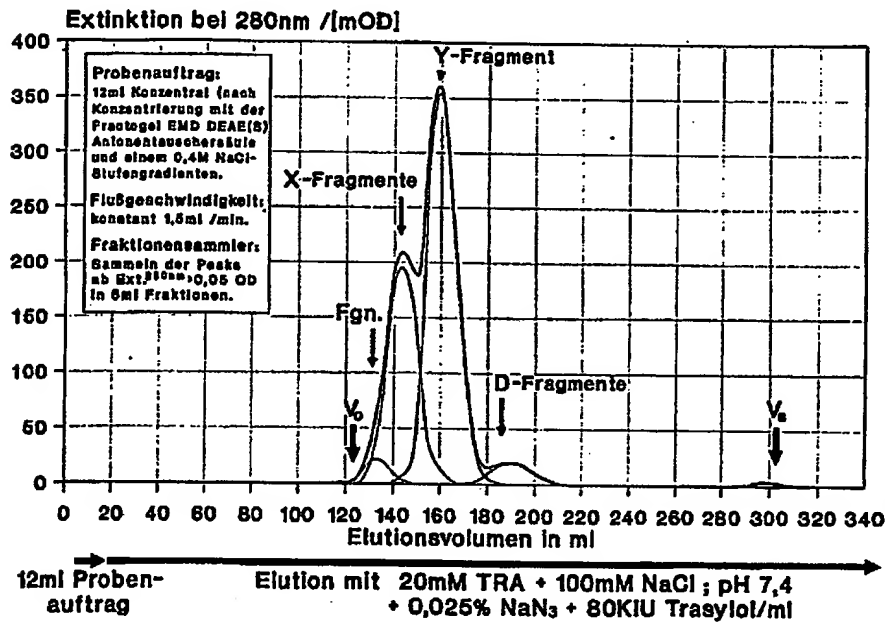


Abb. 3 1. Rechromatographie des caninen Y-Fragment-Pools über Superdex 200 pg (60/2,6) nach Konzentrierung über Fractogel DEAE (S). Man erkennt die Anreicherung von Fragment Y, das nun als Peak eindeutig erkennbar ist. (Abkürzungen: s. Legende zu Abb. 2)

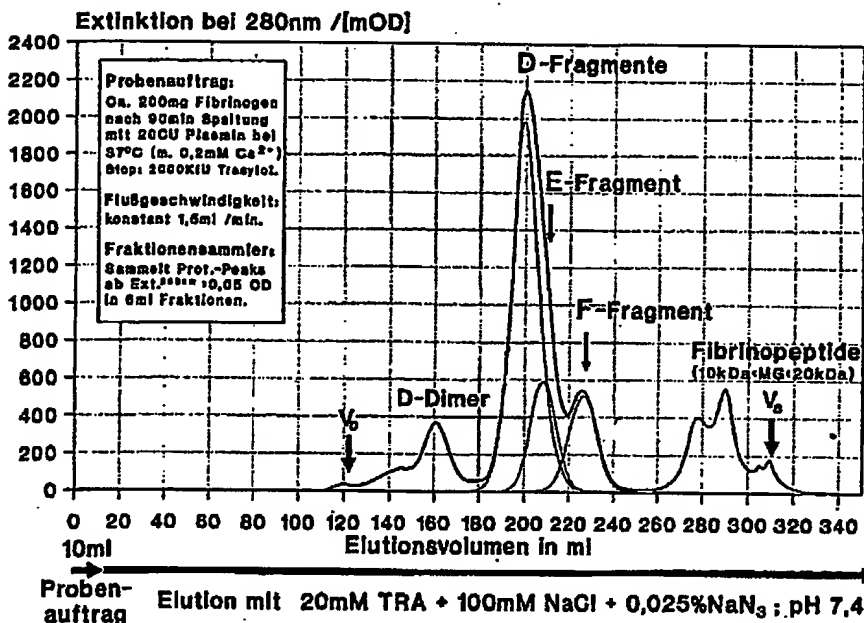


Abb. 4 Gelchromatographie von späten Fibrinogenspaltprodukten über Superdex 200 pg (62/2,6). Die Elutionsvolumina sind aufgrund der etwas größeren Säule und der kleineren Molekulargewichte etwas größer als in Abb. 2. Die Trennung von D- und F-Fragmenten ist durch die höhere Homogenität der D-Fragmente und die verminderte F-Dimerbildung (kleineres F-Fragment) besser. (Abkürzungen: s. Legende zu Abb. 2)

Bei den kleineren Spaltprodukten war die Trennung im verwendeten, sehr hoch auflösenden Tentakel-Anionentauscher deutlich besser. Zusätzlich zu einer hier fast schon Basislinien-Trennung der FSP D und E in einem Lauf (Abb. 5), erhielten wir eine Aufspaltung der D Fragmente in drei Subfraktionen (D_A, D_B, D_C), deren relative Anteile abhängig von den Herstellungsbedingungen (Spaltungsdauer, mit oder ohne Ca²⁺) waren. Durch einmalige Rechromatographie des E-Pools ließ sich hier reines (> 95%iges) Fragment E herstellen. Die D-Subfraktionen waren nach dreimaliger Rechromatographie weitgehend rein dargestellt (> 92%). Alle drei D-Fragmente waren stabil und wandelten sich nicht ineinander um. Bis auf das D_C-Fragment der Spaltung ohne Ca²⁺ (= FSP D₄ mit einem MG von ~85 kDa) unterschieden sie sich jedoch nicht erkennbar im Molekulargewicht (= FSP D₁ mit ~112 kDa).

Die E-Fragment-Präparationen dagegen waren chromatographisch homogen. Nach SDS-PAGE wurde eine dominierende Bande (> 90%) und 2-4 sehr schwache Nebenbanden gefunden. Je nach Herstellungsansatz fand sich nach 3,5 min Inkubation die dominierende Bande bei ~49 kDa, nach 4 h Inkubation die dominierende Bande bei 43 kDa (kleineres Molekulargewicht durch weitergehenden proteolytischen Abbau). Der Zusatz von Ca²⁺ in den Spaltungsansatz veränderte die Eigenschaften der isolierten E-Fragmente (im Gegensatz zu den D-Fragmenten) nicht.

Aus einer Präparation später Spaltprodukte (mit 0,2 mM Ca²⁺) aus 118 mg Fibrinogen wurden so
– 68,2 mg FSP D_A, -D_B, -D_C (= 57,8%),
– 15,9 mg FSP E (= 13,5%) erhalten (Summe = 71,3%).
Im Verlauf der Aufarbeitung trat ein Verlust von 28,7% des eingesetzten Proteins auf. Der größte Teil des Proteinverlustes (~20%) war durch Abtrennung der F-Fragmente und kleinerer FSP bedingt.

Diskussion

Mehr als bei den bisherigen Präparationen (alle FSP (human): Furlan und Beck, 1972; FSP Y, D (human): Nieuwenhuizen et al., 1983a; FSP D und E (canin): Chen et al., 1974, 1975; Chen, 1977) wurde Wert auf eine schonende Trennung der einzelnen

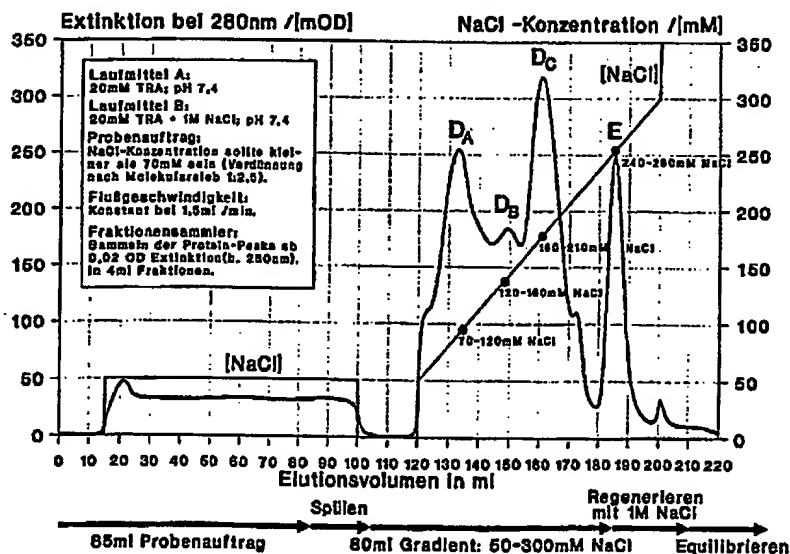
FSP gelegt. So wurde in keinem der Präparationsschritte der physiologische pH-Bereich (pH 6,8–7,5) verlassen und Trenn- oder Konzentrierungstechniken (wie z. B.: Kationentauscherläufe bei sauren pH-Werten (3–5), Fällungsreaktionen mit Hitze, Lösungsmitteln, Salzen oder Thrombin), die eine Veränderung der Struktur, einen Abbau oder gar eine Denaturierung der FSP zulassen könnten (Ugarova und Budzynski, 1992), vermieden.

Das Problem der Trennungen bestand in der ausgeprägten Homogenität der zu reinigenden Spaltprodukte. Durch eine offenbar recht ähnliche Verteilung der Ladungen innerhalb des Fibrinogenmoleküls einerseits, einer Heterogenität der Ladungen innerhalb definierter Fragmentfraktionen andererseits, war die Trennung der frühen Fragmente über einen Ionentauscher oder über eine Chromatofokussierung unbefriedigend, so daß zunächst auf die Differenzierung nach Größe zurückgegriffen werden mußte. Nur die kleineren FSP (D und E) wiesen hinreichend große Ladungsunterschiede für eine Trennung über den Anionentauscher auf. Im Molekularsieb ergab sich durch eine Bindungswechselwirkung zwischen D- und E-Fragmenten keine Trennung.

Da bei humanem Fibrinogen 3 hochaffine Ca²⁺-Bindungsplätze gefunden wurden, von denen 2 auf den beiden D-Fragmenten liegen und der 3., im E-Fragmentbereich lokalisierte, bei der Spaltung durch Plasmin zerstört wird (Ratte: Van Ruijven-Vermeer et al., 1978; Mensch: Lindsay et al., 1978; Nieuwenhuizen et al., 1983b; Furlan, 1988), lag der Versuch einer Trennung mit dem calciumbindende Moleküle in einem Affinitätschromatographie-ähnlichen Modus bindenden Hydroxyapatit (chem. = Calciumphosphat) nahe. Die caninen D- und E-Fragmente wurden jedoch alle stark an das Gelmaterial gebunden, die E-Fragmente nur geringfügig schlechter. Ursache könnte die – beim Molekularsieb beobachtete – Wechselwirkung zwischen den D- und E-Fragmenten sein. Diese Wechselwirkung ist jedoch zu schwach, um das Bindungsverhalten des E-Fragmentes zu erklären. Möglich ist auch der Erhalt der Ca²⁺-Bindungsstelle auf dem caninen E-Fragment.

Die bei der Reinigung im hochauflösenden Anionentauscher beobachtete chromatographische Heterogenität der D-Fragmente und deren Auftrennung wurde in der zugänglichen Literatur (auch bei humanen FSP) bisher nicht beschrieben (Gaff-

Abb. 5 Trennung von späten Fibrinogenspaltprodukten über den Fractogel EMD DEAE (S) Anionentauscher. Man erkennt die 3 wenig getrennten D-Fragmente und das fast vollständig abgetrennte E-Fragment. Die dünne Linie gibt die Salzkonzentration des Eluats wieder. Für jedes Subfragment sind die ermittelten Salzkonzentrationen des Elutionsbereichs angegeben



ney, 1973; Furlan, 1988; Chen et al., 1974, 1975; Chen, 1977). Nach allen Spaltungsansätzen ließen sich drei verschiedene D-Fraktionen D_A (bei ~100 mM NaCl), D_B (bei ~140 mM NaCl) und D_C (bei ~180 mM NaCl) voneinander trennen. Bei Spaltungsansätzen mit 0,2 mM Ca²⁺ ergaben sich andere Mengenproportionen der drei D-Fragmente. Die D_A- sowie die D_B-Fraktionen unterschieden sich in den Ansätzen mit oder ohne Ca²⁺-Zusatz nicht (gleiches Molekulargewicht, gleiche Elutionsprofile). Die beiden D_C-Fraktionen enthielten jedoch verschiedene D-Fragmente. Bei der Spaltung mit Ca²⁺ entstand ein D_C-Fragment mit dem gleichen MG, wie die anderen D-Fraktionen (112 kDa). Ohne Ca²⁺ entstand ein D_C-Fragment mit einem geringeren MG von 85 kDa (ein Ergebnis des hier fehlenden, stabilisierenden Einflusses von Ca²⁺).

Die in den gereinigten Fibrinogen-, FSP X- und Y-Präparaten nach SDS-PAGE beobachteten Spuren niedermolekularer Verunreinigungen (30–63 kDa) wurden durch Rechromatographie über Superdex 200 pg nicht abgetrennt und korrelierten mit ihren Molekulargewichten nicht mit den bekannten FSP, sondern mit den Molekulargewichten einzelner Aminosäureketten der Fraktionen (Pizzo et al., 1972; Furlan und Beck, 1972; Gaffney, 1973), so daß mit den Spurenbanden wahrscheinlich Produkte einer während der Probenvorbereitung (für SDS-PAGE) entstandenen, teilweisen Abspaltung einzelner Aminosäureketten vorlagen.

Zusammenfassung

In unserer Untersuchung wurden zunächst canine Fibrin(ogen)-Spaltprodukte (FSP) nach zwei optimierten Spaltungsprotokollen hergestellt. Diese entweder mit X- und Y-Fragmenten oder D- und E-Fragmenten angereicherten Spaltproduktgemische wurden unter Verwendung von 2 säulenchromatographischen Trenntechniken (Molekularsieb und Anionentauscher) aufgetrennt und die FSP X, -Y, -D und -E in > 95%iger Reinheit dargestellt. Dabei konnte das D-Fragment zusätzlich in insgesamt 4 verschiedene D-Subfraktionen aufgetrennt werden. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) mit C5-Alkylsuperose und Chromatofokussierung sowie Läufe über Hydroxapatit ergaben keine zufriedenstellenden Trennungen. Die beobachtete starke Bindung von Fragment E an Hydroxapatit weist möglicherweise auf den Erhalt der Calciumbindungsstelle auf dem caninen E-Fragment hin.

Summary

In the present investigation we first produced canine fibrinogen degradation products (FDP) following two optimized degradation protocols. These FDP-mixtures, which were alternatively enriched with X and Y fragments or D and E fragments, were purified further to individual FDP X, -Y, -D, and -E with > 95% purity by the means of two low pressure column chromatographic techniques (size exclusion chromatography and anion-exchanger chromatography). With this techniques the FDP D could be separated into four different D subfractions. No satisfactory results were yielded by hydrophobic interaction chromatography (HIC) with C5-Alkylsuperose, chromatofocusing and separations with hydroxapatit. The observed strong binding of fragment E on hydroxapatit probably points to the maintenance of the calcium binding site on the prepared canine E-fragment.

Literaturverzeichnis

Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254. – Chen, J. P., H. M. Shurley, M. F. Vickeroy (1974): A facile separation of fragments D

and E from fibrinogen/fibrin degradation products of three mammalian species. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 61, 66-71. – Chen, J. P., T. Hutchinson, L. B. Nanninga, M. Mason Guest (1975): Characterisation of the terminal degradation products of canine fibrinogen by plasmin. *Biochem. Biophys. Acta* 386, 69-79. – Chen, J. P. (1977): Unique immunological cross-reactivity between fragments D and/or E of three heterologous mammalian fibrinogens. *Thromb. Res.* 11, 31-42. – Furlan, M., E. A. Beck (1972): Plasmic degradation of human fibrinogen. 1. Structural characterization of degradation products. *Biochim. Biophys. Acta* 263, 631-644. – Furlan, M. (1988): Structure of fibrinogen and fibrin. In: Francis, J. L. (ed.): *Fibrinogen, fibrin stabilisation and fibrinolysis*. Weinheim, Cambridge, New York: VCH Verlagsgesellschaft, pp. 16-64. – Gaffney, P. J. (1973): Subunit relationships between fibrinogen and fibrinogen degradation products. *Thromb. Res.* 2, 201-218. – Gaffney, P. J. (1977): Fibrin(-ogen) interactions with plasmin. *Haemostasis* 6, 2-25. – Hammer, A. S., C. G. Couto, C. Swardson, D. Getzy (1991): Hemostatic abnormalities in dogs with hemangiosarcoma. *J. Vet. Int. Med.* 5, 11-14. – Haverkate, F., G. Timan (1977): Protective effect of calcium in the plasmin degradation of fibrinogen and fibrin fragments D. *Thromb. Res.* 10, 803-812. – Jacobsson, K. (1955): Studies on fibrinogen: I. Studies on the determination of fibrinogen in human blood plasma. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 7, 1-54. – Kazal, L. A., S. Amsel, O. P. Miller, L. M. Tocantins (1963): The preparation and some properties of fibrinogen precipitated from human plasma by glycine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 113, 989-994. – Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685. – Lindsay, G. G., G. Brown, L. R. Purves (1978): Calcium binding to human fibrinogen – localization of two calcium specific sites. *Thromb. Res.* 13, 345-350. – Ly, B., H. C. Godal (1973): Denaturation of fibrinogen, the protective effect of calcium. *Haemostasis* 1, 204-209. – Marguerie, G. (1977): The binding of calcium to fibrinogen: some structural features. *Biochim. Biophys. Acta* 494, 172-181. – Mischke, R., I. Nolte (1992): Labordiagnostik und Differentialdiagnose der Verbrauchskoagulopathie beim Hund. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 105, 401-410. – Mischke, R., H. Wolling (1994): Vergleichende Untersuchung zur Kinetik der plasmininduzierten Proteolyse von caninem und humanem Fibrinogen. *Mh. Vet. Med.* 49, 55-65. – Müller, S. (1992): Referenzwerte des ionisierten Kalziums im Vollblut von Hunden im Vergleich mit ausgewählten Erkrankungen. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Dissertation. – Nieuwenhuizen, W., F. Haverkate, A. Vermond, M. Voskuilen (1983a): Calcium-binding sites and antil clotting properties of human fibrin(ogen) fragments. In: *Fibrinogen – Structure, functional aspects, metabolism*, Vol. 2. Berlin, New York, de Gruyter & Co, pp. 97-109. – Nieuwenhuizen, W., A. Vermond, J. Hermans (1983b): Evidence for the localization of a calcium-binding site in the amino-terminal disulfide knot of fibrin(ogen). *Thromb. Res.* 31, 81-86. – Pacques, E. P. (1989): Das fibrinolytische System: eine Übersicht. *GIT Labor-Medizin* 1-2, 3-11. – Pizzo, S. V., M. L. Schwartz, R. L. Hill, P. A. McKee (1972): The effect of plasmin on the subunit structure of human fibrinogen. *J. Biol. Chem.* 247, No. 3, 636-645. – Slappendel, R. J. (1988): Disseminated intravascular coagulation. *Vet. Clin. North. Am.: Small Anim. Pract.* Vol. 18, No. 1, 169-184. – Ugarova, T. P., A. Z. Budzynski (1992): Interaction between complementary polymerization sites in the structural D and E domains of human fibrinogen. *J. Biol. Chem.* 267, 13687-13693. – Van Ruijven-Vermeer, I. A. M., W. Nieuwenhuizen, W. J. Nooijen (1978): Ca binding of rat fibrinogen and fibrin(ogen) degradation products. *FEBS Letters* 93, Nr. 1, 177-180. – Weber, K., M. Osborne (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412. – Wolling, H., R. Mischke (1995): Einfluß von Calcium(2+)-Ionen auf die Spaltung von caninem und humanem Fibrin(ogen) durch Plasmin. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* (im Druck).

Anschrift d. Verf.: Klinik für kleine Haustiere der Tierärztlichen Hochschule, Bischofsholer Damm 15, D-30173 Hannover.